

毕赤酵母中表达透明颤菌血红蛋白提高重组脂肪酶的表达

汪小锋, 孙永川, 申旭光, 柯锋, 徐莉, 刘云, 闫云君

华中科技大学生命科学与技术学院 教育部分子生物物理重点实验室, 武汉 430074

摘要: 解脂耶氏酵母胞外脂肪酶 Lip2 (YLip2) 是一种具有广泛应用前景的工业酶。为了改善高密度发酵生产 YLip2 过程中的溶氧限制, 提高 YLip2 的表达量, 将 YLip2 基因 *lip2* 和透明颤菌血红蛋白 (VHb) 基因 *vgb* 分别置于 *AOX1* 启动子和 *PsADH2* 启动子的调控之下, 进行 YLip2 和 VHb 在毕赤酵母中的共表达。*PsADH2* 启动子来源于树干毕赤酵母 *Pichia stipitis*, 在低氧条件下能被激活。SDS-PAGE 和 CO-差式光谱分析表明, YLip2 和 VHb 在重组菌中成功实现了共表达。在氧限制性条件下, VHb 表达的细胞 (VHb⁺, GS115/9Klip2-pZPVT) 与对照细胞 (VHb⁻, GS115/9Klip2) 相比, 摇瓶和 10 L 发酵罐中 YLip2 表达量分别提高了 25% 和 83%。此外, 在低氧条件下, VHb⁺ 细胞在 10 L 发酵罐中的生物量也比 VHb⁻ 细胞高。文中也获得了一株表达了 VHb 的并携带有多个 *lip2* 基因拷贝的克隆子 GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49#, 在低氧条件下, 该克隆子在 10 L 发酵罐中的最高脂肪酶水解活力达 33 900 U/mL。因此, 在毕赤酵母中用 *PsADH2* 启动子表达 VHb, 同时增加 *lip2* 基因的拷贝数是提高 YLip2 表达量的一种有效策略。

关键词: 脂肪酶, 透明颤菌血红蛋白, *PsADH2* 启动子, 解脂耶氏酵母, 毕赤酵母, 表达

Expression of *Vitreoscilla hemoglobin* improves recombinant lipase production in *Pichia pastoris*

Xiaofeng Wang, Yongchuan Sun, Xuguang Shen, Feng Ke, Li Xu, Yun Liu, and Yunjun Yan

Key Laboratory of Molecular Bio-physics, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 (YLip2) is an important industrial enzyme with many potential applications. To alleviate the dissolved oxygen (DO) limitation and improve YLip2 production during high-cell density fermentation, the YLip2 gene *lip2* and *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) gene *vgb* were co-expressed in *Pichia pastoris* under the control of *AOX1*

Received: June 17, 2011; **Accepted:** September 6, 2011

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2009AA03Z232, 2010AA101501), Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-07-0336), Natural Science Foundation of Hubei Province, China (No. 2009CDA046).

Corresponding author: Yunjun Yan. Tel/Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@tom.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2009AA03Z232, 2010AA101501), 教育部新世纪优秀人才基金 (No. NCET-07-0336), 湖北省自然科学基金 (No. 2009CDA046) 资助。

and *PsADH2* promoter, respectively. The *PsADH2* promoter from *Pichia stipitis* could be activated under oxygen limitation. The SDS-PAGE and CO-difference spectrum analysis indicated that VHb and YILip2 had successfully co-expressed in recombinant strains. Compared with the control cells (VHb⁻, GS115/9*Klip2*), the expression levels of YILip2 in VHb-expressing cells (VHb⁺, GS115/9*Klip2*-pZPVT*lip2* 49#) under oxygen limitation were improved 25% in shake-flask culture and 83% in a 10 L fermentor. Moreover, the VHb⁺ cells displayed higher biomass than VHb⁻ cells at lower DO levels in a 10 L fermentor. In this study, we also achieved a VHb-expressing clone harboring multicopy *lip2* gene (GS115/9*Klip2*-pZPVT*lip2* 49#), which showed the maximum lipolytic activity of 33 900 U/mL in a 10 L fermentor under lower DO conditions. Therefore, it can be seen that expression of VHb with *PsADH2* promoter in *P. pastoris* combined with increasing copies of *lip2* gene is an effective strategy to improve YILip2 production.

Keywords: lipase, *Vitreoscilla* hemoglobin, *PsADH2* promoter, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, expression

巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 具有强启动子、可对表达的蛋白进行翻译后加工与修饰、易于高密度发酵和纯化等优点^[1], 是近年来广泛报道的能高效表达各种外源蛋白的表达系统, 目前已有 600 多种蛋白在毕赤酵母中成功实现了表达^[2]。为了提高重组蛋白的体积生产率, 工业上通常进行高细胞密度发酵^[3]。毕赤酵母高细胞密度发酵过程需要消耗大量的氧气, 通常会造成供氧限制。而氧气在发酵液中的溶解度较低, 且随着发酵液中生物量和消泡剂的增加, 其溶解度和传质效率还会逐步降低^[4], 因此溶氧控制是毕赤酵母高密度发酵过程中影响重组蛋白表达的重要因素。在大规模发酵过程中由于大的发酵罐存在体积大、死角较多, 罐内各部位溶氧分布不均, 导致低氧问题十分突出^[5], 因此利用分子生物学方法改善重组毕赤酵母在低氧条件下的蛋白表达水平意义十分重大。

透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb) 是一种专性好氧的革兰氏阴性丝状菌在低氧环境中产生的一种分子量约为 15.8 kDa 的可溶性蛋白, 具有较高的氧吸附和解离速率常数^[6], 已在多种宿主中成功表达并促进细胞生长和提高代谢物产率^[7]。在毕赤酵母中共表达目的蛋白和 VHb 是改善高密度发酵过程中溶氧限制的一种有效方式。在氧供应正常的情况下, β -半乳糖苷酶与 VHb 在毕赤酵母中共表达对细胞生长没有明显促进作用, 但重组菌中 β -半乳糖苷酶的表达量提高了 4 倍^[3]。此外, 有研究表明, VHb 在毕赤酵母中的表达不仅能提高

氧的利用率和 S-腺苷甲硫氨酸的产率, 还能促进 ATP 合成, 增强甲醇代谢活性^[4]。*PsADH2* 启动子是一种来源于树干毕赤酵母的乙醇脱氢酶 2 (*PsADH2*) 基因的低氧诱导型启动子, 能在氧气限制条件下被激活。该启动子应用于毕赤酵母中表达 VHb 能在低氧条件下改善重组细胞的生长^[8], 提高重组植酸酶的表达量^[5]。

YILip2 是一种重要的微生物脂肪酶, 具有较高的水解、酯化和转酯活力, 在酯合成、生物柴油制备和对映体拆分等领域具有广阔的应用前景^[9-10]。YILip2 已在毕赤酵母中成功实现了高水平的表达^[10-12], 但高密度发酵过程中 VHb 与脂肪酶共表达的研究尚未见有文献报道。本研究中, 首先将 YILip2 基因 (*lip2*) 克隆到 pPIC9K 载体中, 电转化毕赤酵母菌株 GS115, 得到重组菌株 GS115/9*Klip2*。利用重叠 PCR 的方法将 *PsADH2* 启动子和终止子与 VHb 基因 (*vgb*) 融合后单独或与 *lip2* 基因共同整合到诱导型的 pPICZ α A 表达载体中, 电转化 GS115/9*Klip2* 菌株, 实现 VHb 的胞内表达与 YILip2 的分泌表达。同时, 在溶氧限制条件下对重组菌株的细胞生长和脂肪酶的表达水平进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

pPIC9K-Lip2H 和 pMD-VHb 质粒均为本实验室构建并保存。*P. pastoris* GS115 (*his4*)、pPIC9K、

pPICZαA 和 *E. coli* Top10 均购自 Invitrogen 公司。pMD18-T simple 载体购自日本 TaKaRa 公司。*Pichia stipitis* CBS 6054 由杭州师范大学李海峰博士馈赠。

1.1.2 试剂及仪器

胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司; YNB (无氨基酸) 购自 BD 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、高保真 PrimerSTAR HS DNA 聚合酶、DNA 凝胶回收试剂盒等购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 OMGE 公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 所有化学试剂均购自上海国药集团化学试剂有限公司; 10 L 搅拌式发酵罐 (BIOTECH-10JGZ) 购自上海保兴生物设备工程有限公司; GenePulser II 电穿孔仪购自 Bio-RAD 公司; 高速离心机和 PCR 仪均购自德国 Eppendorf 公司; 高压细胞破碎仪购自

英国 Constant Systems 公司。

1.1.3 引物与培养基

根据 NCBI 公布的 DNA 序列设计引物 (表 1), 所有普通 PCR 引物均由上海生物工程公司合成。基因测序由上海桑尼生物科技有限公司完成。YPD、YPDS、BMGY、BMMY、MD、MM 等培养基参考 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。酶活力检测采用 BMMY-罗丹明 B-橄榄油平板 (100 mL 的 BMMY 培养基中加入 1 mL 橄榄油乳化液和 400 μL 的 0.1% 的罗丹明 B); 10 L 发酵罐上采用修饰的 FM22 培养基^[13] (g/L): KH₂PO₄, 42.9; (NH₄)₂SO₄, 5; CaSO₄, 0.6; K₂SO₄, 14.3; MgSO₄ · 7H₂O 11.7; 柠檬酸, 1.9; 甘油, 40 g 和 2.0 mL/L 的微量元素储液 PTM4^[13]。发酵罐补料培养基: 甘油 50% (W/V, 含 4 mL/L PTM4); 甲醇 100% (含 4 mL/L PTM4)。

表 1 本文中所用到的引物

Table 1 The Primers used in this study

Primers	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Restriction site
lip2-F1	GACGAATTCGTGTACACCTCTACCGAGACCTCTC	34	<i>EcoR</i> I
lip2-R1	TATAGCGGCCGCTTAGATACCACAGACACCCTCGG	35	<i>Not</i> I
lip2-F2	ACTGAATTCGTGTACACCTCTACCGAGACC	30	<i>EcoR</i> I
lip2-R2	TATTCTAGATCAGATACCACAGACACCCTCG	31	<i>Xba</i> I
ADH2-P1	CGCGGATCCGCGGAAGCACAGTCTAATGC	29	<i>Bam</i> H I
ADH2-P2	TTGATCCAACATGATAATTTGGATGGATCGCAGCAC	36	
VHb-M1	ATCCAAATTATCATGTTGGATCAACAGACTATCAAC	36	
VHb-M2	ACGGCTTGTTTATTCAACAGCTTGAGCGTACAA	33	
ADH2-T1	GCTGTTGAATAAACAAGCCGTGCTAGATAGTGC	33	
ADH2-T2	CGCGGATCCGCGGAGCTCAGGTAGAAGCCGAAAAGC	36	<i>Bam</i> H I
PIC-LIPF	GCACTGCTCTGGTGAGGTCTT	21	
PIC-LIPR	CCGGCAGAGCACTGTTTATTG	21	
Probe-LIP	FAM-ATTGACTGGCCCCTGATCCACCCT-TAMRA	24	
PIC-GAPF	CGGTGTTTTACCACTTTGGA	21	
PIC-GAPR	CAACGAACATTGGAGCATCCT	21	
Probe-GAP	FAM-CCAAAAGCACATCGACGCCGGT-TAMRA	22	

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建与转化

以 pPIC9K-Lip2H 的质粒 DNA 为模板, 利用 lip2-F1 和 lip2-R1 为引物扩增 lip2 基因, PCR 产物加 A 后连接 pMD18-T simple 载体, 形成的 pMD-lip2 质粒用于转化 *E. coli* Top10, 筛选阳性克隆子并通过测序确认插入基因的正确性。测序正确的 pMD-lip2 质粒经双酶切、胶回收后的目的基因片段插入到 pPIC9K 的 *EcoR* I / *Not* I 位点之间形成 pPIC9K-lip2 质粒; 重组质粒 pPIC9K-lip2 经 *Sal* I 线性化后, 取 10 μ g 与 80 μ L 的 GS115 感受态细胞混合, 在电转参数为 1 500 V、25 μ F、200 Ω 的条件下转化, 得到 GS115/9Klip2 菌株。重组菌株的表型鉴定和高拷贝筛选参考 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。将高 G418 抗性的 Mut⁺ 型克隆子转移到 BMMY-罗丹明 B-橄榄油平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后, 挑取水解圈较大的克隆子进行 PCR 验证和酶活力筛选。脂肪酶活力最高的重组菌株将进行下一步的有关研究。

以树干毕赤酵母基因组 DNA 为模板, 分别以 ADH2-P1/P2 和 ADH2-T1/T2 为引物扩增 *PsADH2* 启动子和终止子。以 pMD-VHb 质粒 DNA 为模板, 以 VHb-M1 和 VHb-M2 为引物扩增 *vgb* 基因片段, 通过重叠 PCR 的方法将 *PsADH2* 启动子和终止子与 *vgb* 基因融合成一个完整的基因 *PVT*。PVT 经 *Bam*H I 酶切后胶回收的片段插入到 pPICZ α A 载体中得到 pPICZPVT。以 pPIC9K-lip2 的质粒 DNA 为模板, 以 lip2-F2 和 lip2-R2 为引物扩增 lip2 基因, PCR 产物经 *Eco*R I / *Xba* I 双酶切、胶回收后, 整合到 pPICZPVT 载体中形成 pPICZPVT-lip2 质粒。通过测序验证重组质粒 pPICZPVT 和 pPICZPVT-lip2 构建成功。重组质粒经 *Bst*X I 线性化后电转化 GS115/9Klip2, 得到重组菌株 GS115/9Klip2-pZPVT 和 GS115/9Klip2-pZPVTlip2。采用 YPDS-Zeocin 抗性平板筛选高拷贝克隆子。将高 Zeocin 抗性的克隆子转移到 BMMY-罗丹明 B-橄榄油平板上, 28 $^{\circ}$ C 培

养 3 d 后, 挑取水解圈较大的克隆子进行 PCR 验证和酶活力筛选。

1.2.2 高产菌株的筛选与摇瓶发酵

随机挑取 60 个水解圈较大的克隆子接种于装有 50 mL BMGY 培养基的 500 mL 摇瓶中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 下培养 16~18 h, 当吸光度 $OD_{600}=4\sim6$ 时, 离心收集菌体后转移到 50 mL 的 BMMY 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、220 r/min 下继续诱导培养, 每隔 24 h 添加 1.5% (V/V) 的甲醇, 并取样检测生物量和发酵液上清的酶活力。对筛选到的高脂肪酶活力的重组菌株进行发酵 pH 和甲醇添加量的优化, 为发酵罐中高密度发酵提供一定的参考。

1.2.3 分批补料培养

将 -80 $^{\circ}$ C 保存的克隆子接种到 30 mL 的 YPD 培养基中, 培养 16 h 后转接到装有 400 mL BMGY 培养基的 2 L 摇瓶中, 培养 18~20 h, 当 $OD_{600}=4\sim6$ 时, 以 10% 的接种量接入到起始装液量为 4 L FM22 培养基的发酵罐中, 进行分批补料培养。菌体生长阶段和诱导阶段温度分别设定为 29 $^{\circ}$ C 和 25 $^{\circ}$ C, 搅拌速度 500~800 r/min, DO 维持在 10%~25% 之间, 通气量维持在 4~12 L/min, 流加 28% 的氨水和 30% 的磷酸自动控制 pH, 菌体生长阶段和诱导阶段分别为 6.0 和 6.5。当甘油耗尽后, 补加 400 mL 50% 的甘油; 当 DO 再次上升后, 流加 100% 甲醇至罐中的甲醇的浓度为 0.5%, 0~6 h 流加速度为 1.5~3.5 mL/(L·h), 6~24 h, 逐渐提高流加速度到 6~8 mL/(L·h), 并一直维持该速度至发酵结束, 发酵过程中根据 DO 的波动适当调节甲醇流速。每隔一段时间取样测定菌体湿重、酶活力和蛋白质含量。

1.2.4 生物量和重组菌株遗传稳定性的测定

取 5 mL 发酵液至预先已称重的离心管中, 4 $^{\circ}$ C 下 8 000 r/min 离心 10 min, 用无菌水洗涤细胞 2 次, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后称重, 计算细胞湿重 (WCW)。取发酵罐中培养 160 h 的发酵液 1 mL 用无菌水适当稀释, 取 80 μ L 稀释液涂布在 YPD 平板上, 待平板上有菌落形成, 用牙签挑取 100

个单克隆到固体 YPD-G418-Zeocin 选择培养基上, 菌斑出现后统计双抗平板上的菌斑数量, 计算工程菌种质粒的丢失率, 重复操作 3 次。

1.2.5 Vhb 活力的检测

Vhb 活性检测采用 CO-差光谱法^[8]。10 mL 发酵液在 5 000 r/min 离心 5 min 后, 细胞重悬于 100 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5, 包含 50 mmol/L NaCl), 高压细胞破碎后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 取 3 mL 上清用缓冲液稀释 1 倍并加入连二亚硫酸钠至终浓度为 2.5 mg/mL, 通入 CO 气体室温避光孵育 3 min, 用美谱达 1800PC 紫外可见分光光度计在 400~500 nm 波段扫描得到 CO-差示光谱图。

1.2.6 脂肪酶活力测定与蛋白质分析

脂肪酶活性测定采用碱式滴定法^[12]。操作步骤如下: 酶活力测定以橄榄油乳化液 (橄榄油:PVA=1:3, V/V) 为底物, 底物 4 mL、Tris-HCl (pH 8.0, 50 mmol/L) 5 mL 和适当稀释的发酵上清液 1 mL 组成 10 mL 反应体系, 40 °C 水浴反应 10 min 后加入 15 mL 终止液 (乙醇:丙酮=1:1, V/V) 终止反应。酶催化水解产生的脂肪酸通过 0.05 mol/L NaOH 滴定测得, 加两滴 0.5% 酚酞指示滴定终点。在 40 °C、pH 8.0 的条件下, 脂肪酶每分钟水解橄榄油产生 1 μmol 游离脂肪酸所需的酶量定义为一个活力单位 (U)。蛋白浓度测定采用 BCA 蛋白浓度定量检测试剂盒。SDS-PAGE 检测目的蛋白的分子量和表达水平, 蛋白质染色采用考马斯亮蓝 R-250。

1.2.7 重组菌中 lip2 基因拷贝数的检测

TaqMan 实时荧光定量 PCR 法检测毕赤酵母基因组中 lip2 基因的拷贝数由广州吉坤生物技术有限公司完成。毕赤酵母 GAP 基因的标准品、lip2 基因和 GAP 基因的引物、探针均由广州达安基因公司提供。阳性重组质粒 pPICZαA-lip2 和 pPIC3.5K-vgb 作为标准品质粒, 重组菌株的基因组 DNA 作为模板, 均由本实验室提供。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建

去自身信号肽的 lip2 基因的 PCR 扩增产物长度为 906 bp, PsADH2 启动子和终止子与 vgb 基因通过重叠 PCR 的方法融合成长度为 1 383 bp 的完整基因 PVT, 经过测序验证正确后分别插入到 pPIC9K 和 pPICZαA 载体中, 得到重组质粒 pPIC9K-lip2 和 pPICZPVT。再将以 lip2-F2 和 lip2-R2 为引物扩增得到 lip2 基因插入到 pPICZPVT 中, 获得重组质粒 pPICZPVT-lip2。通过 PCR 和测序证实所有的重组质粒构建正确。

2.2 高产菌株的筛选与摇瓶发酵

重组质粒 pPIC9K-lip2 电转化毕赤酵母 GS115 后得到重组菌株 GS115/9Klip2。从 BMMY-罗丹明 B-橄榄油平板上随机挑选 60 个水解圈较大的 Mut⁺ 型克隆子进行摇瓶发酵。以 BMMY 为诱导培养基培养 96 h, 筛选到一株最高脂肪酶水解活力为 1 200 U/mL 的克隆子 GS115/9Klip2 58#。以该工程菌为基础, 考察了发酵 pH 和甲醇添加量对 YILip2 表达量的影响 (图 1)。每 24 h 甲醇添加量为 1.5% (V/V) 时, YILip2 的表达量最高 (图 1A); 脂肪酶的表达量随初始诱导 pH 的增加而增加, 当 pH 为 6.5 时达到最高, 过高和过低的 pH 都不利于 YILip2 的表达 (图 1B)。因此, 后续的实验中诱导 pH 采用 6.5, 每 24 h 甲醇添加量为 1.5% (V/V)。

pPICZPVT-lip2 和 pPICZPVT 经 BstX I 线性化后转化 GS115/9Klip2 58# 宿主, 得到重组菌株 GS115/9Klip2-pZPVT 和 GS115/9Klip2-pZPVTlip2。空载质粒 pPICZαA 转化 GS115/9Klip2 58# 宿主得到一株阳性克隆子 GS115/9Klip2-ZαA 9# 作为对照菌株。以 BMMY 为诱导培养基培养 96 h, 重组菌株 GS115/9Klip2-pZPVT 和 GS115/9Klip2-pZPVTlip2 中的最高脂肪酶活力的克隆子 28# 和 49# 的 YILip2 水解活力分别达到 1 500 U/mL 和 4 000 U/mL。

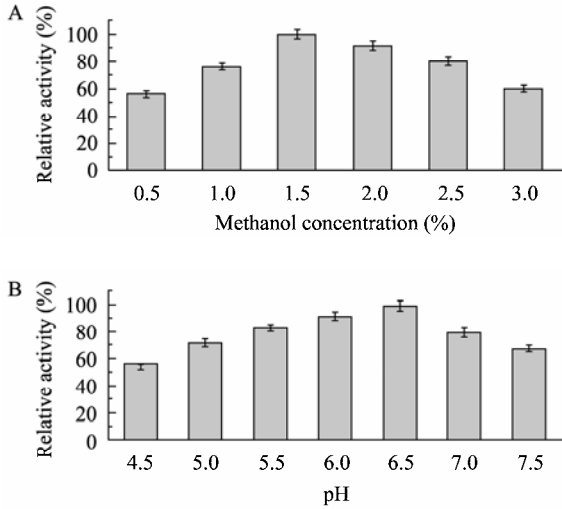


图1 不同的甲醇浓度和诱导 pH 对 YILip2 产酶的影响
Fig. 1 Effects of different methanol concentration (A) and induction pH values (B) on YILip2 production.

2.3 VHb 和 YILip2 在毕赤酵母中的表达

提高摇瓶装液量和降低转速, 创造 DO 限制性条件, 从而使低氧压力启动子能启动 *vgb* 基因的表达。为了考察 DO 限制性条件下 VHb 和 YILip2 在毕赤酵母中的表达情况, 对 4 个重组菌株 (GS115/9Klip2 58#, GS115/9Klip2-ZaA 9#, GS115/9Klip2-pZPVT 28#, GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49#) 在摇瓶中的发酵条件进行了研究, 发酵条件为: 装液量 100 mL/500 mL, 转速 150 r/min, 诱导时间 96 h。由于低氧压力启动子启动 *vgb* 表达效率不高, VHb 在胞内的表达量不高, 因此一般采用 CO-差式光谱法检测 VHb 是否实现功能表达。由图 2 可知, VHb⁺细胞 (GS115/9Klip2-pZPVT 28#) 在 420 nm 附近有典型的特征吸收峰, 而 VHb⁻细胞 (GS115/9Klip2 58#) 在 420 nm 处没有特征吸收峰, 说明胞内表达出了具有生物活性的 VHb 蛋白。

对以上菌株在 DO 限制性发酵条件下的发酵液上清和细胞破碎液进行 SDS-PAGE 分析 (图 3)。表达了 VHb 的重组菌株的发酵液上清中均有一条明显的分子量大约为 38 kDa 的蛋白, 与 *Y. lipolytica* 野生

菌产生的 YILip2 的分子量大小相当。

在低氧条件下, 对照菌株 GS115/9Klip2 58#和 GS115/9Klip2-ZaA 9#的表达量都很低, 而 GS115/9Klip2-pZPVT 28#和 GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49#表达量较高。

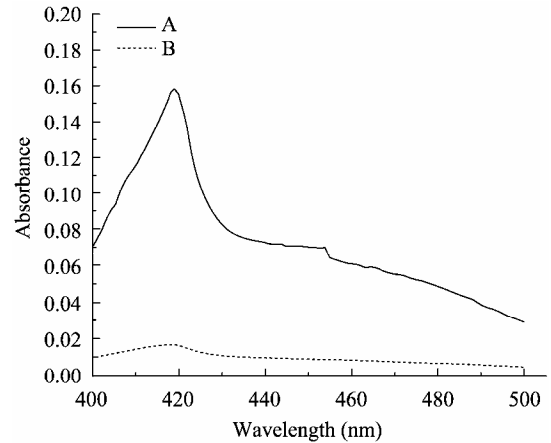


图2 重组菌株的 CO-差式光谱分析

Fig. 2 CO-difference spectrum analysis of the recombinant strains. A: GS115/9Klip2-pZPVT 28#; B: GS115/9Klip2 58#.

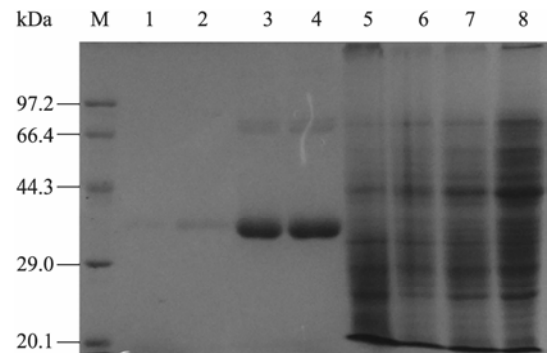


图3 SDS-PAGE 分析 YILip2 在毕赤酵母中的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of YILip2 expressed in *P. pastoris*. M: protein marker; 1-4: 4 μ L of culture supernatant of GS115/9Klip2 58#, GS115/9Klip2-ZaA 9#, GS115/9Klip2-pZPVT 28#, GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49#; 5-8: 5 μ L cell homogenates of GS115/9Klip2 58#, GS115/9Klip2-ZaA 9#, GS115/9Klip2-pZPVT 28#, GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49#.

2.4 VHb 对重组细胞的生长和 YILip2 表达的影响

考察了摇瓶中 VHb 的表达对 VHb⁺转化子和对照菌株生长和 YILip2 表达的影响。由图 4 可知, VHb 的表达对重组菌的生长没有明显促进作用, 但能提高 YILip2 的表达量。VHb⁺细胞中 YILip2 的表达量与 VHb⁻细胞和对照菌株 GS115/9Klip2-ZαA 9#相比分别提高了 25% 和 36%。GS115/9Klip2-pZPVTip2 49#转化子中 YILip2 的表达量与 VHb⁺细胞相比得到了显著提高。TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测发现 GS115/9Klip2-pZPVTip2 49#转化子基因组中 *lip2* 基因有 8 个拷贝, 而 VHb⁺细胞的基因组中只有 4 个拷贝, 因此拷贝数的增加导致了 YILip2 的表达量进一步提高。

2.5 VHb 对高密度发酵生产 YILip2 的影响

为了考察低氧条件下 VHb 的表达对高密度发酵

生产 YILip2 的影响, DO 和转速采取串级控制以维持 DO 在 10%~25% 之间。由图 5 可知, 在高密度发酵过程中, VHb 的表达不仅促进了 VHb⁺细胞的生长, 也显著提高了 YILip2 在 VHb⁺细胞中的表达量。

经过 153 h 的培养, VHb⁺细胞分泌表达的 YILip2 活力达到最大, 为 15 900 U/mL, 是 VHb⁻细胞的 1.83 倍。同时对 VHb⁺转化子 GS115/9Klip2-pZPVTip2 49#在低氧条件下的高密度发酵过程进行了研究 (图 6), 结果发现 YILip2 的表达量得到了进一步的提高, 经过 143 h 的培养, YILip2 最高活力达到 33 900 U/mL, 总蛋白质含量最高达到 6.79 g/L。另外, 考察了 GS115/9Klip2-pZPVTip2 49#菌株在不同 DO 限制性条件下表达 YILip2 的水平 (图 7), 发现在溶氧受限的情况下该工程菌也能获得较高的表达量, 但随着溶氧浓度的降低, YILip2 的表达量也随之降低。

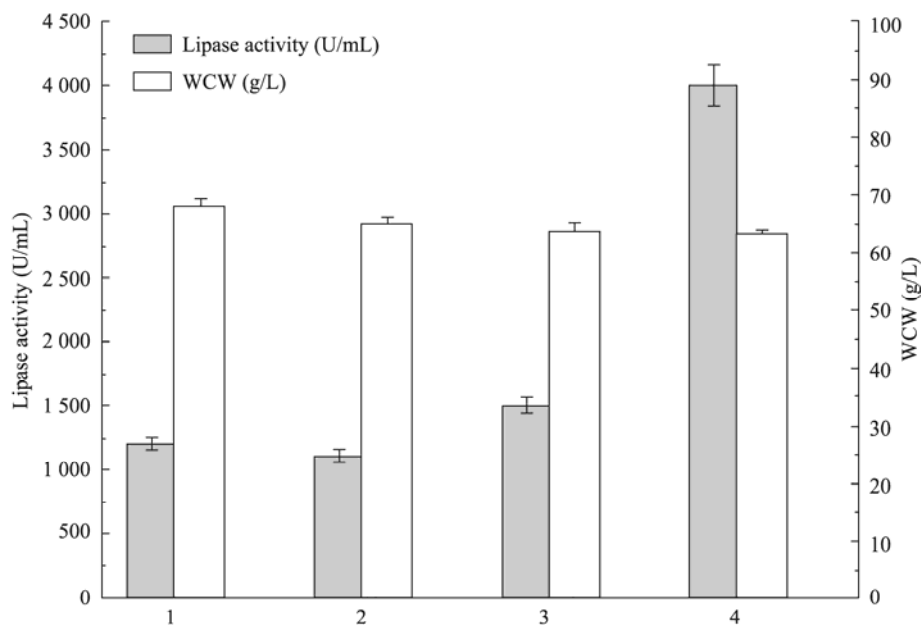


图 4 甲醇诱导 96 h 后 VHb⁺转化子和对照菌株生物量和脂肪酶活力的对比

Fig. 4 Comparison of biomass and lipase activity between VHb⁺ transformants and control strains after 96 h methanol induction. 1: GS115/9Klip2 58#; 2: GS115/9Klip2-ZαA 9#; 3: GS115/9Klip2-pZPVTip2 28#; 4: GS115/9Klip2-pZPVTip2 49#. WCW: wet cell weight.

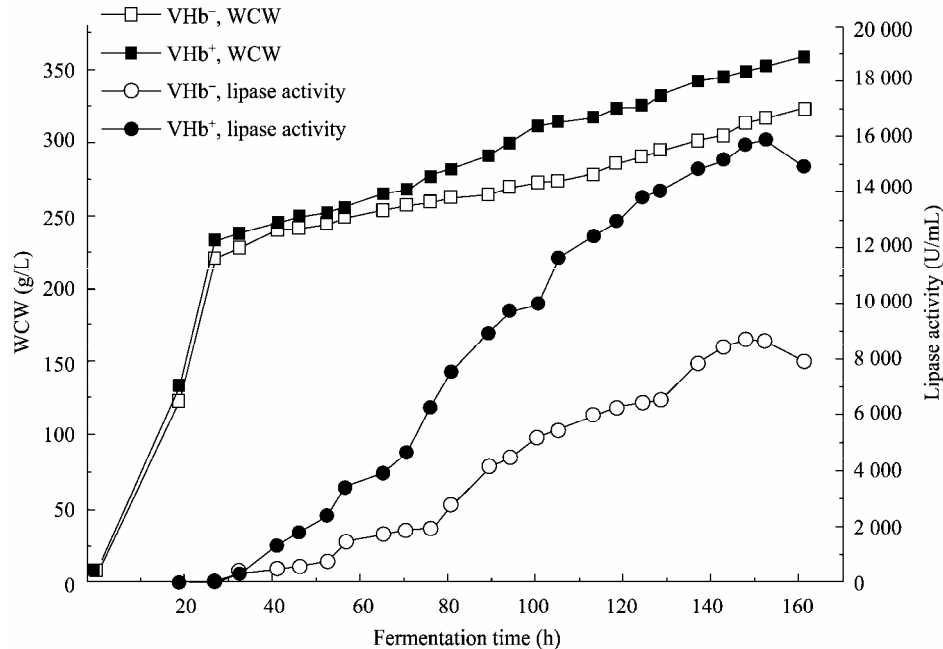


图5 Vhb⁺和Vhb⁻细胞在DO受限的高密度发酵过程中细胞生长和脂肪酶活力的对比

Fig. 5 Comparison of cell growth and lipase activity between Vhb⁺ and Vhb⁻ cells under limiting DO condition during high cell density fermentation. WCW: wet cell weight.

3 讨论

YLip2 是目前已报道的脂肪酶中蛋白表达量较高的脂肪酶之一, 具有十分广阔的应用前景。为了降低该脂肪酶的生产 and 应用成本, 加快其产业化, 许多研究致力于通过分子生物学的方法和发酵过程优化策略提高其表达量^[10-11,14-15]。传统的诱变育种和同源表达已有效提高了 YLip2 的表达量^[14-15], 脂肪酶最高的活力达到 10 000 U/mL^[15]。由于 *Y. lipolytica* 基因组中有多个脂肪酶基因^[11], 尽管分泌到胞外的脂肪酶主要是 YLip2, 但用野生菌株生产很难保证得到的脂肪酶是单一脂肪酶。毕赤酵母表达系统是近年来应用十分广泛的表达系统, 在毕赤酵母中异源表达 YLip2 能获得更高的表达量, 并且能得到纯度较高的单一脂肪酶, 发酵工艺控制较为简单, 总的生产成本也相对较低。当采用橄榄油为底物的碱滴定法测定脂肪酶活力时, Yu 等^[12]报道毕赤酵母中表达重组的 YLip2 的最高活力为 11 000 U/mL。

本研究中获得 GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49#转化子的最高酶活力达到 33 900 U/mL, 明显高于 Yu 等^[11-12]和 Turki 等^[15]的报道, 并且该工程菌的遗传稳定性较好, 经过 196 h 的培养, 重组质粒保存率为 99.7%。

毕赤酵母高密度发酵大量表达外源蛋白时通常会引起溶氧的限制, 若发酵罐的供氧不足就会直接导致细胞生长缓慢, 甲醇及其代谢副产物的积累, 最终导致蛋白表达量的下降。改善溶氧限制的方法很多, 主要包括提高搅拌转速、通气量、罐压、调节甲醇补料速率、降低温度、降低发酵液粘度、通空气与纯氧的混合气、培养基中添加氧载体等^[16]。但以上方法都不能从根本上解决溶氧限制的问题, 也无法解决大规模发酵罐中由于溶氧分布不均而导致的低氧问题, 并且会间接增加发酵过程的成本。因此, 在工程菌中引入透明颤菌血红蛋白共表达的方法, 能有效提高重组细胞对氧的利用率、促进细胞生长、改善细胞的表达量、降低发酵过程的动力

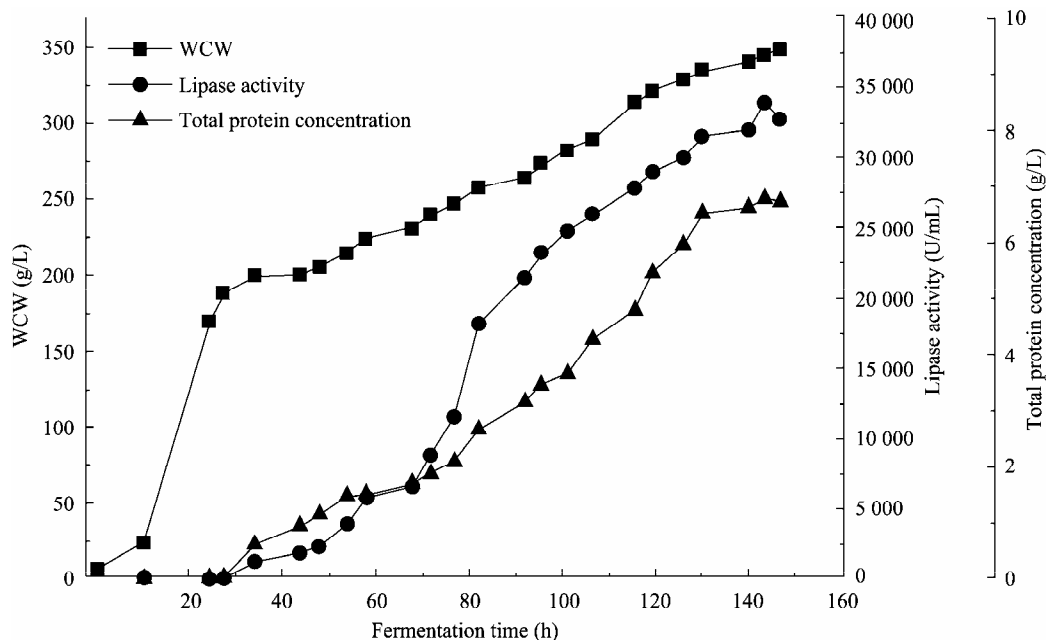


图 6 GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49#菌株在 10 L 发酵罐中生产 YILip2 的脂肪酶活力、生物量和总蛋白浓度的过程变化曲线

Fig. 6 Time course of lipase activity, biomass and total protein concentration during the production of YILip2 using GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49# strain in a 10-L fermentor. WCW: wet cell weight.

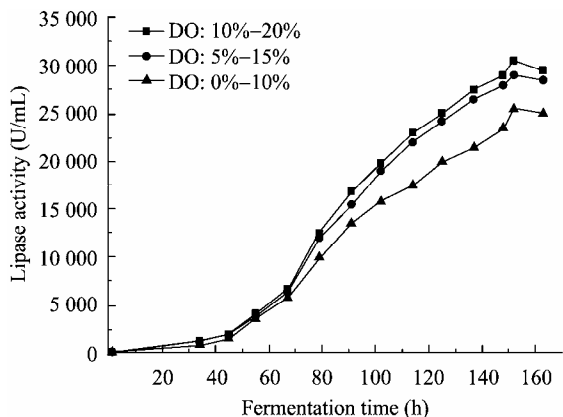


图 7 不同 DO 限制性条件对 GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49#菌株表达 YILip2 的影响

Fig. 7 Effect of different limiting DO levels on YILip2 production by GS115/9Klip2-pZPVTlip2 49# strain.

成本。应用 *AOX1* 强启动子表达 VHb 有效促进了外源蛋白的表达^[3-4]，但应用低氧压力启动子 *PsADH2* 表达 VHb 也能改善重组细胞的生长^[8]，提高外源蛋

白的表达量^[5]，并且对改善重组细胞的呼吸代谢具有其独特性。细胞在溶氧正常的情况下 VHb 不表达，不影响重组细胞的正常代谢，在低氧的情况下启动 VHb 的表达，可提高细胞对氧的利用、改善细胞的生长，进而提高外源蛋白的表达。但 DO 限制性条件下 VHb 对重组细胞摄氧的改善作用也是有限的，一定的范围内 (5%~20%) 对重组细胞表达外源蛋白不会产生较大的影响，但过低的溶氧浓度依然会对 VHb⁺细胞产生不利的影响 (图 7)。

本研究中成功构建了 VHb 的胞内表达和 YILip2 胞外分泌表达的重组工程菌株，*vgb* 和 *lip2* 基因的表达分别通过 *PsADH2* 和 *AOX1* 启动子调控。在摇瓶发酵中，VHb 在低氧条件下的表达对重组菌的生长没有明显的促进作用，但使 YILip2 的表达量提高了大约 25%。这与 VHb 同植酸酶在 *P. pastoris* 中的共表达对细胞生长无明显影响，而植酸酶的表达量得到提高的结果相类似^[5]。摇瓶中溶氧测定困难，

无法获知摇瓶中溶氧的限制程度,可能是由于摇瓶中氧的浓度过低导致 VHB⁺细胞的生长也受到一定抑制。10 L 发酵罐中的实验证实了低氧条件下 VHB 的表达改善了 VHB⁺细胞的生长,提高了 YILip2 的表达量,因此有效改善了发酵罐中溶氧的限制,也间接降低了发酵过程的动力成本。本研究中获得的一株含有 8 个 *lip2* 基因拷贝的 VHB⁺转化子 GS115/9K*lip2*-pZPVT*lip2* 49#, 在低氧的高密度发酵过程中 YILip2 的最高活力达到 33 900 U/mL, 明显高于 Yu 等^[10-11]在溶氧正常条件下单独表达 *lip2* 基因获得的 YILip2 的表达量,为该脂肪酶的大规模工业化生产和应用奠定了基础。因此,基于以上结果,我们认为 *PsADH2* 启动子调控下的 *vgb* 基因与其他工业酶基因在毕赤酵母中的共表达将能促进细胞生长、提高外源蛋白的表达量,这种策略具有重要的应用前景。

REFERENCES

- [1] Li PZ, Anumanthan A, Gao XG, et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 142(2): 105–124.
- [2] Zhang AL, Luo JX, Zhang TY, et al. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(6): 1611–1619.
- [3] Wu JM, Hsu TA, Lee CK. Expression of the gene coding for bacterial hemoglobin improves β -galactosidase production in a recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(17): 1457–1462.
- [4] Chen HX, Chu J, Zhang SL, et al. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(6): 1205–1212.
- [5] Tang HG, Huang HQ, Luo HY, et al. Expression of bacterial hemoglobin with a low O₂-induced promoter improves recombinant phytase production in *Pichia pastoris*. *J Agri Sci Tech*, 2008, 10(3): 84–89.
唐辉桂, 黄火清, 罗会颖, 等. 利用透明颤菌血红蛋白在低氧条件下提高毕赤酵母中植酸酶的表达. *中国农业科技导报*, 2008, 10(3): 84–89.
- [6] Zhang L, Li YJ, Wang ZN, et al. Recent developments and future prospects of *Vitreoscilla* hemoglobin application in metabolic engineering. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(2): 123–136.
- [7] Wei XX, Chen GQ. Applications of the VHB gene *vgb* for improved microbial fermentation processes. *Methods Enzymol*, 2008, 436: 273–287.
- [8] Chien LJ, Lee CK. Expression of bacterial hemoglobin in the yeast, *Pichia pastoris*, with a low O₂-induced promoter. *Biotechnol Lett*, 2005, 27(19): 1491–1497.
- [9] Liu WS, Zhao HY, Jia B, et al. Surface display of active lipase in *Saccharomyces cerevisiae* using Cwp2 as an anchor protein. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(2): 255–260.
- [10] Yu MR, Wen S, Tan TW. Enhancing production of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 in *Pichia pastoris*. *Eng Life Sci*, 2010, 10(5): 458–464.
- [11] Yu MR, Lange S, Richter S, et al. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein Expr Purif*, 2007, 53(2): 255–263.
- [12] Wang XF, Shen XG, Zhao HY, et al. High-level expression and purification of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 with six histidine tags in *Pichia pastoris*. *China Biotechnol*, 2011, 31(4): 53–59.
汪小锋, 申旭光, 赵鹤云, 等. 带 His-tag 的解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2 在毕赤酵母中的表达及纯化. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(4): 53–59.
- [13] Plantz BA, Sinha J, Villarete L, et al. *Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(2): 297–305.
- [14] Fickers P, Fudalej F, Nicaud JM, et al. Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol*, 2005, 115(4): 379–386.
- [15] Turki S, Ayed A, Chalghoumi N, et al. An enhanced process for the production of a highly purified extracellular lipase in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 160(5): 1371–1385.
- [16] Lin JH. High density fermentation control of *Pichia pastoris*. *China Biotechnol*, 2009, 29(5): 120–125.
林俊涵. 毕赤酵母高密度发酵工艺的研究. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(5): 120–125.